

## 明 細 書

### 糖化アミンの測定方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、酸化還元反応を用いて、糖化タンパク質等の糖化アミンを測定する方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 血球中の糖化ヘモグロビン(中でも「HbA1c」)は、その濃度が生体血糖値の過去の履歴を反映することから、糖尿病診断や治療等における重要な指標とされている。このHbA1cの測定は、一般に、免疫学的方法、HPLC法等によって行われている。

[0003] しかしながら、全血や血球中には、測定対象である糖化ヘモグロビン(糖化Hb)以外にも、非測定対象物として、糖化アミン(例えば、糖化アルブミン、糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸等)等の種々の糖化物が存在する。このため、このような測定対象物以外の糖化物(非測定対象物)をも測定してしまい、結果的に、真値よりも高い測定値が得られたり、偽陽性を示すという問題がある。

[0004] このような問題を解決するために、前記免疫学的方法においては、例えば、以下のような方法が提案されている。すなわち、測定対象物と抗測定対象物抗体との主反応に先立って、非測定対象物と抗非測定対象物抗体とのコンプレックスを形成させ、非測定対象物の構造を、糖化Hbの免疫反応に影響しないものに変化させる方法や(例えば、特許文献1参照)、B/F分離によって、試料から非測定対象物を分離除去する方法等である。また、HPLC法においては、例えば、1つの試料について2本のHPLCカラムを準備し、1本目のカラムで試料から非測定対象物を除去し、2本目のカラムで測定対象物の分離分析を行う方法が提案されている。

[0005] しかしながら、前記免疫学的方法によると、高コストであり、また、主反応とは別の抗原抗体反応をさらに必要とするため、反応系の環境設定が複雑化し、測定に長時間を要するという問題がある。また、B/F分離については、操作が煩雑になることが明らかである。さらに、抗体は特異性を有する物質(抗原)に対してのみ効果を奏するため、試料に含まれる非測定対象物の種類が不明であったり、その種類が多数である

場合等、十分に非測定対象物の影響を排除することは困難である。また、HPLC法においても、2本のカラムを使用するため高コストは回避し難く、また、非測定対象物の分離に時間を有するため、測定精度の向上を目的した場合、測定時間の短縮には限度がある。

- [0006] 一方、近年、糖化Hbをはじめとする各種糖化タンパク質の測定に、酸化還元反応を利用した酵素法が広く適用されており、実用化が図られている。具体的には、以下示すようにして測定されている。
- [0007] まず、血球を溶血させた試料を調製し、この溶血試料にプロテアーゼを添加して、糖化Hb分解物を生成させる。さらに、この分解物にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(以下、「FAOD」という)を添加し、これを糖化Hbの糖化部分に作用させ、その酸化還元反応により過酸化水素を発生させる。この過酸化水素量は前記糖化タンパク質量に対応している。そして、この反応液にペルオキシダーゼ(以下、「POD」という)および酸化により発色する基質を添加し、酵素反応により前記発色性基質を発色させる。この発色を測定することにより前記過酸化水素量を測定でき、この結果、血球中の糖化Hbを決定できるのである。
- [0008] しかし、このような酵素法においても、前述と同様に、試料中に含まれる非測定対象物である糖化物が原因となり、真値よりも高い値を示すという問題がみられる。そこで、この問題を解決するために、酵素法においても次のような方法が本出願人により提案されている(例えば、特許文献2)。
- [0009] すなわち、第1の方法として、予め、測定対象糖化Hbへの反応性が低いFAOD(分解用FAOD)を試料に添加することにより、非測定対象の糖化物を処理しておき、その後、糖化Hbのプロテアーゼ分解物を、糖化Hbへの反応性が高いFAOD(測定用FAOD)で処理することによって測定する方法が提案されている。
- [0010] また、第2の方法として、予め、糖化Hbへの反応性が高い少量のFAOD(分解用FAOD)で試料を前処理した後、この試料をプロテアーゼで処理し、再度、前述と同じFAOD(測定用FAOD)を添加する方法が提案されている。この第2の方法において、分解用FAODの添加量を少量とする、詳しくは、測定用FAODに対する前処理用FAODの比を小さくするのは、速度論の点から、前処理の段階における糖化Hbと

FAODとの反応を防止するためである。さらに、前記第2の方法におけるプロテアーゼの添加は、前記糖化Hbの分解を目的とするだけでなく、初めに添加した分解用FAODを失活させることも目的としている。なぜなら、初めに添加した分解用FAODが残存すると、プロテアーゼの添加によって生成された糖化Hb分解物が残存FAODと反応してしまうからである。

特許文献1:特開2000-180439号公報

特許文献2:国際公開第03-033729号パンフレット

### 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0011] しかしながら、従来の第1の酵素法によると、予め前処理用FAODにより非測定対象物に対する前処理を行っても、主反応に使用する測定用FAODは異なる触媒機能であるために、この測定用FAODが作用する非測定対象物は処理し切れてない状態となる。このため、測定精度の向上は見られるものの、さらなる精度の向上が求められている。また、第1の酵素法では、(1)前処理用FAOD、(2)プロテアーゼ、(3)測定用FAOD(+POD)という、少なくとも3種類の試薬をそれぞれ別個に使用した三段階の反応が必須となるため、測定に時間がかかり、試薬の調製にも手間がかかる。

[0012] 一方、従来の第2の酵素法では、前述のように、前処理FAODの添加量を少量とすることが必要であり、かつ、測定用FAODの添加に先立って、前処理用FAODをほぼ完全に失活させることが重要となる。しかし、前処理FAODを少量とすると、非測定対象物を消化するために十分な処理時間の確保が必要となり、完全な消化を試みると、処理時間が長くなり、ひいては全測定時間が長くなるという問題がある。さらに、前処理FAOD、プロテアーゼ、測定用FAODによる各処理は、いずれも同時に行うことができないことも、測定時間に影響を与えている。

[0013] そこで、本発明は、糖化アミンの測定方法の提供であって、これによって、容易且つ簡便に、信頼性に優れた糖化アミンの測定を可能にすることを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0014] 前記目的を達成するために、本発明の糖化アミン測定方法は、プロテアーゼを試

料に添加して、前記プロテアーゼにより前記試料中の測定対象である糖化アミンを分解する工程と、前記試料にFAODを添加して、前記FAODを糖化アミンの分解物に作用させて酸化還元反応を行う工程と、前記酸化還元反応を測定する工程と、前記酸化還元反応の測定結果により、前記糖化アミンの量を決定する工程とを含む、糖化アミンの測定方法であって、さらに、前記測定対象糖化アミンとは別に前記試料中に存在する非測定対象である糖化アミンの影響を除去することを目的として、前記プロテアーゼを添加する分解工程に先立ち、前記試料に前記FAODを添加して、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程を含み、前記分解工程に先立って添加したFAODによって、前記分解工程後の前記酸化還元反応を行うことを特徴とする。なお、本発明において測定対象物である糖化アミンは、「測定対象糖化アミン」と、非測定対象物である糖化アミンは、「非測定対象糖化アミン」といい、非測定対象糖化アミンに対するFAOD反応を「前処理反応」、測定対象糖化アミンに対するFAOD反応を「主反応」ともいう。

- [0015] 前記FAODは一般名称であって、その基質特異性はFAODの種類により様々であり、糖化アミノ酸だけでなく、糖化ペプチドや糖化タンパク質にも作用し得る酵素である。また、前記糖化アミンとしては、例えば、糖化タンパク質、糖化ペプチド、糖化アミノ酸等が含まれるが、本発明において「測定対象糖化アミン」とは、糖化タンパク質または糖化ペプチドを示す。

#### 発明の効果

- [0016] 本発明者らは、糖化Hbをはじめとする糖化アミンの測定方法について鋭意研究を行った。その結果、予め試料にFAODを添加することによって非測定対象糖化アミンを処理した後、プロテアーゼを添加して、このプロテアーゼによる測定対象糖化アミンの分解物に、すでに添加されているFAODを作用させるという本発明に想到した。この方法によれば、予め試料にFAODを添加して、非測定対象物を処理するため、プロテアーゼによる分解反応ならびに主反応を行う際には、FAODと作用する非測定対象物はすでに消化されていることとなる。したがって、非測定対象物が原因となる偽陽性や測定値の上昇(高値化)を防止し、著しく優れた測定精度を確保できるのである。また、本発明によれば、予めFAODによって非測定対象糖化アミンを処理さ

すれば、その後は、後述するように、プロテアーゼによる測定対象物の分解、酸化還元反応等は、経時的に行ってもよいし同時に行うこともできる。このため、測定における反応工程数を極めて少ない2工程にまで減少することができ、簡便な操作が可能になる。また、臨床検査だけでなく食品分析等にも広く適用されている従来の酵素法においては、サンプルをプロテアーゼで処理した後に、主反応の酵素を添加することが基本形態であり、本発明のように、プロテアーゼの添加に先立って主反応の酵素FAODを添加できることも、本発明者らが初めて見出したことである。したがって、このような本発明の測定方法を、例えば、前述のような糖化Hbの測定に適用すれば、糖化Hbの糖尿病診断の指標としての信頼性も増し、臨床医療等の分野において有用な方法となる。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0017] 本発明の測定方法は、前述のように、プロテアーゼを試料に添加して、前記プロテアーゼにより前記試料中の測定対象である糖化アミンを分解する工程と、前記試料にFAODを添加して、前記FAODを糖化アミンの分解物に作用させて酸化還元反応を行う工程と、前記酸化還元反応を測定する工程と、前記酸化還元反応の測定結果により、前記糖化アミンの量を決定する工程とを含む、糖化アミンの測定方法であって、さらに、前記測定対象糖化アミンとは別に前記試料中に存在する非測定対象である糖化アミンの影響を除去することを目的として、前記プロテアーゼを添加する分解工程に先立ち、前記試料に前記FAODを添加して、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程(前処理工程)を含み、前記分解工程に先立って添加したFAODによって、前記分解工程後の前記酸化還元反応を行うことを特徴とする。つまり、前記分解工程前に、前記非測定対象糖化アミンに作用させるために添加したFAODによって、さらに、前記分解工程後の酸化還元反応を行うことができるのである。

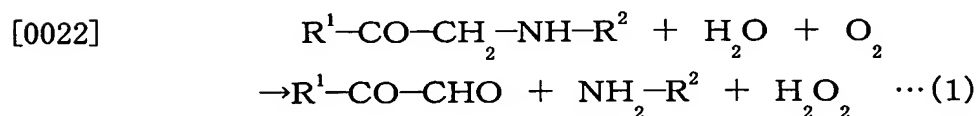
[0018] 前記測定対象物としては、前述のような酸化還元反応を利用できる糖化アミンであれば特に制限されず、本発明による測定が可能である。具体的な測定対象糖化アミンとしては、糖化Hb、糖化アルブミン等の糖化タンパク質、糖化ペプチドがあげられ、本発明の測定方法は、中でも血球内糖化アミン、特に糖化Hbの測定に有用である。

。

[0019] 本発明において、前記酸化還元反応工程は、例えば、FAODを糖化アミン分解物に作用させて過酸化水素を発生させる工程であり、前記酸化還元反応を測定する工程は、前記試料に酸化酵素（例えば、POD）と酸化により発色する基質とを添加して、前記発生した過酸化水素と前記基質とを前記酸化酵素により反応させる工程を含むことが好ましい。この反応により前記基質が発色するため、この発色量の測定により、前記酸化還元反応を測定できる。

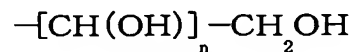
[0020] 本発明において、前記分解工程と、前記酸化還元反応工程と、前記酸化還元反応を測定する工程とを同時に行うことが好ましい。これによって、測定工程が低減され、操作を迅速かつ簡便に行うことができる。具体的には、例えば、(1)前記前処理工程の後、前記試料に、プロテアーゼ、酸化酵素および酸化により発色する基質を同時に添加する、(2)前記分解工程に先立って、前記FAODと共に前記酸化酵素を前記試料に添加し、さらに、プロテアーゼおよび酸化により発色する基質を同時に前記試料に添加する、または、(3)前記分解工程に先立って、前記FAODと共に前記酸化により発色する基質を前記試料に添加し、さらに、プロテアーゼおよび酸化酵素を同時に前記試料に添加することによって、前述の3つの工程を同時に行うことができる。

[0021] 本発明の測定方法において使用するFAODは、下記式(1)に示す反応を触媒するFAODであることが好ましく、例えば、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD- $\alpha$ 」という）、アミノ酸側鎖のアミノ基が糖化された糖化アミンに特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD-S」という）、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された糖化アミンおよびアミノ酸側鎖のアミノ基が糖化された糖化アミンのいずれにも特異的に作用するFAOD（以下、「FAOD- $\alpha$ S」という）等があげられる。



[0023] 前記式(1)において、 $R^1$ は、水酸基もしくは糖化反応前の糖に由来する残基（糖残基）を意味する。前記糖残基( $R^1$ )は、反応前の糖がアルドースの場合はアルドース残基であり、反応前の糖がケトースの場合、ケトース残基である。例えば、反応前の

糖がグルコースの場合は、アマドリ転位により、反応後の構造はフルクトース構造をとるが、この場合、糖残基( $R^1$ )は、グルコース残基(アルドース残基)となる。この糖残基( $R^1$ )は、例えば、



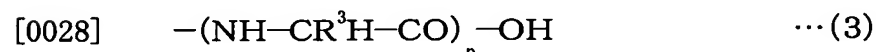
で示すことができ、 $n$ は、0～6の整数である。

[0024] 前記式(1)において、 $R^2$ は、特に制限されないが、糖化アミンが糖化アミノ酸または糖化ペプチド(糖化タンパク質を含む)の場合、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合と、それ以外のアミノ基(アミノ酸側鎖のアミノ基)が糖化されている場合とで異なる。

[0025] 前記式(1)において、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されている場合、 $R^2$ は、下記式(2)で示すアミノ酸残基またはペプチド残基である。この場合に前記式(1)の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD- $\alpha$ およびFAOD- $\alpha$ Sである。



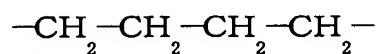
[0027] 前記式(2)において、 $R^3$ はアミノ酸側鎖基を示し、 $R^4$ は水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基を示し、例えば、下記式(3)で示すことができる。下記式(3)において、 $n$ は、0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様に、アミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっても良い。



[0029] また、前記式(1)において、 $\alpha$ -アミノ基以外のアミノ基が糖化されている(アミノ酸側鎖基が糖化されている)場合、 $R^2$ は下記式(4)で示すことができる。この場合に前記式(1)の反応を特異的に触媒するのが前記FAOD-SおよびFAOD- $\alpha$ Sである。

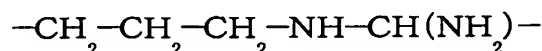


[0031] 前記式(4)において、 $R^5$ は、アミノ酸側鎖基のうち、糖化されたアミノ基以外の部分を示す。例えば、糖化されたアミノ酸がリジンの場合、 $R^5$ は



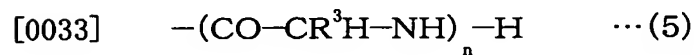
であり、

例えば、糖化されたアミノ酸がアルギニンの場合、 $R^5$ は、

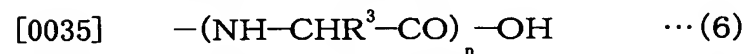


である。

[0032] また、前記式(4)において、 $R^6$ は、水素、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(5)で示すことができる。なお、下記式(5)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっているいても良い。



[0034] また、前記式(4)において、 $R^7$ は、水酸基、アミノ酸残基またはペプチド残基であり、例えば、下記式(6)で示すことができる。なお、下記式(6)において、 $n$ は0以上の整数であり、 $R^3$ は、前述と同様にアミノ酸側鎖基を示し、アミノ酸側鎖基は全て同一でも、異なっているいても良い。



[0036] 前記糖化 $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用するFAOD- $\alpha$ としては、例えば、市販の商品名フルクトシル-アミノ酸オキシダーゼ(FAOX-TE)(キッコーマン社製)、ペニシリウム属由来FAOD(特開平8-336386公報)等があげられる。前記アミノ酸残基の糖化された側鎖に特異的に作用するFAOD-Sとしては、例えば、フサリウム属由来FAOD(日本生物工学会大会 平成12年度「Fusarium oxysporum由来アミノ酸オキシダーゼの基質特異性の変換;藤原真紀 他」)等があげられる。また、前記糖化 $\alpha$ -アミノ基および糖化側鎖基の両方に作用するFAOD- $\alpha$ Sとしては、例えば、市販の商品名FOD(旭化成社製)、ギベレラ属由来FAOD(特開平8-154672号公報)、フサリウム属由来FAOD(特開平7-289253号公報)、アスペルギルス属由来FAOD(WO99/20039号)等があげられる。

[0037] これらのFAODは、測定対象糖化アミンの種類に応じて適宜決定することができる。測定対象物が前述のように糖化Hbの場合には、その $\beta$ 鎖N末端バリンにおける $\alpha$ -アミノ基の糖化程度を測定することによってHbA1c(%)を算出できるため、糖化 $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用するFAOD- $\alpha$ を使用することが好ましい。特に、FAOD- $\alpha$ である商品名FAOX-TEは、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された遊離の「バリン」に特異的に作用するため、N末端配列が「Val-His-Leu・・・」となる $\beta$ 鎖N末端バリンや、N末端配列が「Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp・・・」となる $\alpha$ 鎖N末端バリンからValを遊離させ

て、糖化程度を測定するのに適している。また、前記FAOD- $\alpha$ 、特に、Fusarium sp.GL2-1(FERM BP-8451)から常套手段によって得られるFAODを使用することもできる。このFAOD- $\alpha$ は、 $\alpha$ -アミノ基が糖化された遊離のValや、Val-Leu、Val-Leu-Ser、Val-His、Val-His-Leu等に特異的に作用するため、 $\alpha$ 鎖や $\beta$ 鎖のN末端からこれらの配列を遊離させて、糖化量を測定するのに適している。また、測定対象物が、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸(糖化Val)やペプチド(糖化Val-His)、 $\epsilon$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸(糖化Lys)やペプチド(糖化Lys-Thr、糖化Lys-Ser)等の場合には、糖化Lysおよび糖化Valの両方に特異的に作用するFAOD- $\alpha$ Sを使用することが好ましい。

[0038] 前記プロテアーゼとしては、特に制限されず、メタロプロテイナーゼ、ブロメライン、パパイン、トリプシン、プロテイナーゼK、ズブチリシンおよびアミノペプチダーゼからなる群から選択された少なくとも一つのプロテアーゼが使用できるが、測定対象糖化アミンの種類に応じて選択することが好ましく、特に、測定対象糖化アミンを選択的に分解できるプロテアーゼ、FAODが作用し易い分解物を特異的に遊離できるプロテアーゼが好ましい。測定対象糖化アミンを選択的に分解できるプロテアーゼであれば、例えば、試料中に他の糖化アミン(特に、糖化タンパク質、糖化ペプチド)が存在する場合であっても、これらの糖化アミンは分解され難く、FAODが作用し易い分解物も発生しないため、測定精度をより一層向上できるからである。具体的に、測定対象物が前述のような糖化Hbである場合、糖化Hbを選択的に分解するプロテアーゼが好ましく、例えば、メタロプロテイナーゼ、ブロメライン、パパイン、ブタ膵臓由来トリプシン、Bacillus subtilis由来のプロテアーゼ等があげられ、より好ましくはメタロプロテイナーゼ、Bacillus subtilis由来のプロテアーゼであり、特に好ましくはメタロプロテイナーゼである。

[0039] また、前述のようなFAOD- $\alpha$ を使用する際には、FAOD- $\alpha$ が作用し易い分解物、例えば、 $\beta$ 鎖N末端バリリン、もしくはこれを含むペプチド(例えば、ジペプチド、トリペプチド等)を、特異的に遊離できるプロテアーゼが好ましく、ズブチリシン、プロナーゼ、アンギオテンシン変換酵素等が使用できる。具体的には、例えば、糖化Hbをズブチリシン、プロナーゼ等で処理することによってVal-His-Leuのトリペプチドを遊

離でき、さらにHis-Leuに特異的なアンギオテンシン変換酵素で処理すれば、糖化バリン(フルクトシルバリン)を遊離することができる。

- [0040] また、フサリウム属(例えば、Fusarium sp.GL2-1(FERM BP-8451))由来のFAOD- $\alpha$ を使用する際には、例えば、 $\alpha$ 鎖N末端バリン、もしくはこれを含むペプチド(例えば、ジペプチド、トリペプチド等)を、特異的に遊離できるプロテアーゼが好ましく、例えば、エンドプロテイナーゼASP-N等が使用できる。具体的には、例えば、糖化Hbを前記エンドプロテイナーゼASP-Nで処理することによって、Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Aspペプチドを遊離でき、さらにカルボキシペプチダーゼYで処理することによって糖化Val-Leuを遊離できる。また、糖化アルブミンの場合は、例えば、プロテイナーゼK、ズブチリシン、フィシン、エラスターゼ、サーモリシン等が使用でき、アルブミンの種類(例えば、HSA, BSA等)はその由来に何ら制限されず、測定できる。

- [0041] 本発明において、測定試料は特に制限されず、例えば、全血、血漿、血清、血球、尿、髄液等の生体試料や、ジュース等の飲料水、醤油、ソース等の食品類等の試料に対しても、本発明の測定方法を適用できる。この中でも、本発明の測定方法は、例えば、前記全血、血漿、血清、血球などの血液試料やその他の生体試料に有用である。例えば、前記血球成分である糖化アミンを測定する場合には、全血をそのまま溶血させたものを試料としてもよいし、全血から赤血球を分離して、前記赤血球を溶血させたものを試料として用いてもよい。また、点滴等の成分には、例えば、グルコース等の糖類や各種アミノ酸が含まれる場合が多いため、これらの成分から糖化アミンが生成されることにより、患者の血液等に一過的に糖化アミノ酸が増加する場合がある。したがって、このような点滴後の患者の血液試料等にも本発明の測定方法は極めて有用である。

- [0042] 本発明において、前記酸化還元反応の測定は、前記FAODの酸化還元反応により発生した、測定対象糖化アミン由来の過酸化水素量の測定であることが好ましい。過酸化水素の量は、例えば、PODによって、測定対象糖化アミン由来の過酸化水素を還元し、同時に酸化により発色する基質(発色性基質)を酸化し、発色した前記基質の発色程度を測定することによって、決定できる。

- [0043] なお、PODの添加順序は特に制限されず、例えば、前記プロテアーゼの添加前または添加後に添加してもよいし、前記プロテアーゼの添加と同時に添加してもよい。また、発色性基質の添加も同様に制限されない。なお、具体例については後述する。
- [0044] つぎに、本発明の測定方法について、非測定対象物を含む全血試料における、血球中の糖化Hbを測定する一例をあげて説明する。なお、この実施形態において「糖化アミノ酸」とは、特に示さない限り、試料中に含まれる非測定対象糖化アミノ酸のことをいい、測定対象物である糖化タンパク質のプロテアーゼ分解物としての糖化アミノ酸は含まない。
- [0045] まず、全血を溶血して溶血試料を調製する。この溶血方法は、特に制限されず、例えば、界面活性剤を用いる方法、超音波による方法、浸透圧の差を利用する方法、凍結溶解による方法等が使用できる。この中でも、操作の簡便性等の理由から、界面活性剤を用いる方法が好ましい。
- [0046] 前記界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレン-p-t-オクチルフェニル エーテル(Triton系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン ソルビタン アルキル エステル(Tween系界面活性剤等)、ポリオキシエチレン アルキル エーテル(Brij系界面活性剤等)等の非イオン性界面活性剤が使用でき、具体的には、例えば、商品名TritonX-100、商品名Tween-20、商品名Brij35等があげられる。前記界面活性剤による処理条件は、通常、処理溶液中の血球濃度が1〜10体積%の場合、前記処理溶液中の濃度が0.1〜1重量%になるように前記界面活性剤を添加し、室温で5秒〜1分程度攪拌すればよい。
- [0047] また、前記浸透圧の差を利用する場合は、例えば、全血の体積に対し2〜100倍体積量の精製水を添加して溶血させる。
- [0048] つぎに、前記溶血試料にFAODを添加する。このFAODの添加によって、前記溶血試料中の非測定対象糖化アミンであって、前記FAODの基質となり得るものが分解される(前処理工程)。具体的には、FAODが触媒する前記式(1)の反応によって、非測定対象糖化アミンの糖化部分が、過酸化水素の発生を伴って分解される。このように、FAODと反応可能な非測定対象糖化アミンは、この段階ですでに分解さ

れているため、次工程において、糖化Hbをプロテアーゼで分解しても、本工程で添加したFAODと非測定対象物が反応することではなく、糖化Hb分解物のみをFAODと反応させることができるのである。また、この工程と前記溶血処理とを同時に行うこともできる。

[0049] なお、この工程で発生した非測定対象由来の過酸化水素は、血球中に含まれるグルタチオンペルオキシダーゼやカタラーゼによって発生と同時に速やかに消失するため、現段階で発生した過酸化水素が、後述する糖化Hb由来の過酸化水素の測定(POD反応)に影響を及ぼすことはない。このように発生と同時に瞬時に過酸化水素が消化されることは、例えば、反応液中に含まれるHbと非測定対象物の含有割合や、反応速度論の点から考慮しても明らかであり、また、POD反応に影響を与えないことは、後述する実施例の結果からも明らかである。

[0050] このように、測定対象糖化アミンが糖化Hbをはじめとする血球内成分である場合、血球中に本来存在しているカタラーゼ等によって、非測定対象糖化アミンの分解で発生した過酸化水素が速やかに分解されるために、別途カタラーゼ等を添加することがなく、操作がより一層簡便となる。なお、試料が血球を含まない場合(例えば、血清試料、尿等)、すなわち血球中のカタラーゼを含まない場合には、別途カタラーゼを添加して、非測定対象糖化アミン由来の過酸化水素を消去してもよい。このように前記カタラーゼにより過酸化水素を消去した場合、後に行うFAOD処理で生成する過酸化水素までもが消去されることを防ぐために、前記酸化還元反応の測定の際には、過剰量のPODおよび発色性基質を添加することが好ましく、また、前記PODおよび発色性基質の添加は、例えば、FAODの添加前またはFAOD添加と同時であることが好ましい。この場合、PODは、前記カタラーゼの添加量(U)に対し、例えば、5〜100倍の活性(U)量を添加することが好ましい。

[0051] また、非測定対象糖化アミンから発生する過酸化水素を処理する方法としては、この他に以下の方法も採用できる。例えば、プロテアーゼを添加する前に、FAODとPODならびに電子供与体を共存させる方法がある。これによれば、プロテアーゼを添加する前に、非対象糖化アミンより発生した過酸化水素は、POD反応によって脱水素を起こし、電子は電子供与体に供与される。このため、後にプロテアーゼを添加し

ても、過酸化水素は消去されており、測定対象糖化アミンに対する測定には影響がない。また、プロテアーゼを添加する前に、FAODとPODならびに酸化により発色する発色剤を添加し、この発色量を予め測定しておき、この発色量で補正を行うことも可能である。

[0052] 前記溶血試料に対するFAODの添加量は、非測定対象物の処理ならびに後述する糖化Hb分解物の処理を十分に行うことができる量であればよい。例えば、溶血試料中のHb濃度等によって適宜決定することができるが、非測定対象物を迅速に消去するために過剰量を添加することが好ましい。具体的には、反応液において、血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、FAOD 0.1〜30U/Lの範囲であり、好ましくは2〜10U/Lであり、より好ましくは3〜6U/Lである。また、反応液において、全血濃度が0.3体積%の場合、FAOD 0.1〜45U/Lの範囲であり、好ましくは2〜15U/Lであり、より好ましくは3〜9U/Lである。

[0053] このFAOD処理の条件は、特に制限されないが、反応温度は、例えば、2〜60℃、好ましくは4〜40℃であり、反応時間は、例えば、1〜30分間、好ましくは3〜5分間であり、pHは、例えば、6〜9の範囲である。また、この処理は、通常、緩衝液中で行われ、前記緩衝液としては、特に制限されないが、例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、EPPS緩衝液、PIPES緩衝液等があげられる。

[0054] なお、前記溶血工程とFAODの添加工程は、別々に行ってもよいが、時間の短縮、工程の簡略化の点から、同時に行うことが好ましい。特に、試薬キットを用いた本発明の測定方法の実行を考慮すると、溶血ならびに非測定対象糖化アミンのFAOD処理を同時に行うことによって、試薬数を低減できるため好ましい。

[0055] 続いて、前記FAODを添加した反応液に、さらにプロテアーゼ、およびPODと酸化により発色する基質(発色性基質)を添加する。このように前記プロテアーゼの添加によって、糖化Hbは、先に添加したFAODが作用し易いように分解され、この分解物とFAODとの間で前記式(1)に示す反応が起こり、糖化Hb由来の過酸化水素が発生する。つまり、プロテアーゼの添加によって、自動的にすでに添加されているFAODによる酸化還元反応が開始するのである。そして、発生すると同時に、前記過酸化水素はPODにより還元され、一方、共存する前記発色性基質は酸化され、発色を呈す

るのである。この発色は、例えば、分光光度計等により吸光度として測定することができ、その結果から過酸化水素量を決定できる。そして、例えば、この過酸化水素濃度と検量線等とを用いて、試料中の糖化Hbの量(糖化量)を求めることができる。

[0056] この処理は、通常、前述のような緩衝液中で行われ、条件は、使用するプロテアーゼの種類、測定対象の糖化タンパク質の種類およびその濃度等により適宜決定される。

[0057] 前記反応液中におけるプロテアーゼの濃度は、血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、10KU/L〜300MU/Lの範囲であり、好ましくは1MU/U〜60MU/L、より好ましくは5MU/L〜30MU/Lであり、前記反応液において、全血濃度が0.3体積%の場合、10KU/L〜150MU/Lの範囲であり、好ましくは1MU/L〜30MU/Lであり、より好ましくは5MU/L〜15MU/Lである。

[0058] また、前記反応液中におけるPOD濃度は、例えば、過剰量であることが好ましい。PODが過剰量であれば、発生と同時に、過酸化水素と迅速に反応させることができ、例えば、試料中のカタラーゼによる影響を十分に抑制できるからである。具体例としては、反応液中の血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、0.01KU/L〜4MU/Lの範囲であり、好ましくは0.1KU/L〜200KU/L、より好ましくは5KU/L〜100KU/Lであり、前記反応液において、全血濃度が0.3体積%の場合、0.01KU/L〜2MU/Lの範囲であり、好ましくは0.1KU/L〜100KU/Lであり、より好ましくは5KU/L〜50KU/Lである。前記反応液中における発色性基質の濃度は、血球濃度が0.3体積%の場合、例えば、0.01〜300  $\mu$ mol/Lの範囲であり、好ましくは1〜100  $\mu$ mol/L、より好ましくは5〜30  $\mu$ mol/Lである。

[0059] この処理の条件は、特に制限されないが、反応温度は、例えば、2〜60℃、好ましくは4〜40℃であり、反応時間は、例えば、1〜30分間、好ましくは3〜10分間であり、pHは、例えば、6〜9の範囲である。

[0060] 前記発色性基質としては、例えば、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬と4-アミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげられる。前記トリンダー試薬としては、例えば、フェノール、フェノール誘導体、アニリン誘導体、ナフトー

ル、ナフトール誘導体、ナフチルアミン、ナフチルアミン誘導体等があげられる。また、前記アミノアンチピリンの他に、アミノアンチピリン誘導体、バニリンジアミンスルホン酸、メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(MBTH)、スルホン化メチルベンズチアゾリノンヒドラゾン(SMBTH)等も使用できる。このような発色性基質の中でも、特に好ましくは、前述のように、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウムである。

[0061] 本発明において、前記プロテアーゼの添加後に、前記試料にPODおよび発色性基質を添加して、プロテアーゼ処理とPOD処理とを別個に行うこともできるが、以下の理由より、前記両処理を同時に行うことが好ましい。すなわち、第1に、プロテアーゼと共に、PODおよび発色性基質を添加すれば、発生した過酸化水素は瞬時にPODと反応し、前述のようにカタラーゼによって消去されるおそれがないからである。第2に、前記両処理を1工程とすれば、測定をよりいっそう簡便かつ迅速に行うことができる。また、第3に、試薬キットを用いた測定を考慮すれば、工程数に応じて試薬数を低減できるため、低コスト化も可能になるからである。特に、従来の第2の酵素法においては、通常、少なくとも分解用FAOD処理、プロテアーゼ処理および測定用FAOD処理という3工程以上の処理が必要であり、また、従来の第1の酵素法でも測定用FAODの安定性の面から、プロテアーゼと測定用FAODを別々の試薬として調製しなければならないために、使用する試薬は少なくとも3試薬系が必要であった。しかしながら、本発明によれば、非測定対象物の除去を1工程(溶血処理を含んでもよい)、プロテアーゼ処理およびPOD処理を1工程とする合計2工程という、極めて少ない工程数での反応が可能である。このため、FAODを含む試薬(溶血試薬を含んでもよい)、プロテアーゼとPODと発色性基質とを含む試薬の2試薬系による測定が実現できるのである。このように2試薬系での測定が可能になったことは、コストの面、簡便性の点からも極めて有用である。

[0062] また、プロテアーゼ処理とPOD処理とを同時に行うには、例えば、前述のように、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させた後、前記試料に、プロテアーゼ、PODおよび発色性基質を同時に添加すればよい。また、この他に、前記分解工程に先立って、FAODと共にPODを試料に添加し、さらに、プロテアーゼおよび発色

性基質を同時に試料に添加してもよい。また、前記分解工程に先立って、FAODと共に発色性基質を前記試料に添加し、さらに、プロテアーゼおよびPODを同時に試料に添加することによっても行える。なお、このような場合において、溶血処理を行う際には、前記FAODと共に、さらに溶血試薬を添加すればよい。

[0063] 前記過酸化水素量は、前記POD等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

[0064] また、本発明においては、より一層、測定精度を向上させるために、プロテアーゼによる分解工程前に、さらに、各種添加剤を添加することもできる。前記添加剤としては、例えば、テトラゾリウム化合物があげられる。前記テトラゾリウム化合物を添加することによって、例えば、以下のような様々な効果を得ることができる。通常、血液試料等には、アスコルビン酸等の還元物質が存在するため、これによって酸化により発色した基質が還元され発色が消失するというような問題が起こるが、テトラゾリウム化合物の添加によって、このような問題が回避でき、測定精度をさらに向上できる。また、テトラゾリウム化合物の添加により、測定対象糖化アミンの分解が促進され、効率良くFAODが分解物に作用するという効果もある。

[0065] 前記テトラゾリウム化合物としては、その種類は特に制限されないが、例えば、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムや、その塩(例えば、モノナトリウム塩)等があげられる。

[0066] また、前記テトラゾリウム化合物と同様に、WO 03/107011に開示されているようなスルホン酸化合物やニトロ化合物等も使用できる。具体例としては、ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(SDBS)、ラウリル硫酸リチウム(LiLS)、4-アミノアゾベンゼン-4'-スルホン酸ナトリウム(ABSA)、4-アミノ-4'-ニトロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム(ANDS)、4,4'-ジアゾスチルベンゼン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム(DADS)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸、N-シクロヘキシル-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸、ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)、バソフェナントロリンスルホン酸等や、2,4-ジニトロフェノール(2,4-DNP)、2,5-ジニトロフェニル、2,6-ジニトロフェニル、4,6-ジニトロ-2-メチルフェノール、2-アミノ-4-ニトロフェノール

、2-アミノ-5-ニトロフェノール、2-アミノ-4-ニトロフェノール、p-ニトロフェノール(p-NP)、2,4-ジニトロアニリン(2,4-DNA)、p-ニトロアニリン(p-NA)、亜硝酸ナトリウム( $\text{NaNO}_2$ )、亜硝酸カリウム( $\text{KNO}_2$ )、4-アミノ-4'-ニトロスチルベンゼン-2,2'-ジスルホン酸2ナトリウム(ANPS)、ニトロベンゼン等があげられる。

[0067] また、さらに、前述のようなテトラゾリウム化合物の効果を向上するために、例えば、界面活性剤をあわせて前記試料に添加することが好ましい。前記界面活性剤としては、特に制限されないが、トリトンX-100やTWEEN20などに代表される非イオン性界面活性剤；ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、CHAPS等に代表される陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウム等に代表される陽イオン界面活性剤等があげられる。また、この他にも、尿素等が添加物として使用できる。

[0068] 一般に糖化アミン(特に糖化タンパク質)の糖化率を求める場合には、タンパク質の量とタンパク質の糖化量をそれぞれ測定し、この両者から糖化率が算出される。本発明の測定方法において、測定対象糖化アミンが糖化Hbの場合、Hbの測定は、従来公知の方法で行うこともできるが、例えば、前記試料にテトラゾリウム化合物、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸リチウム、アジ化ナトリウム等を添加して、前記Hbを変性によって安定化させ、その吸光度を測定することによって求めることもできる(例えば、WO 02/27330参照。)。また、測定対象糖化アミンが糖化アルブミンの場合には、オルトクレゾール、ブロムクレゾールグリーン等の公知の物質を用いて、アルブミン量を測定することができる。

[0069] つぎに、本発明の測定キットは、前述の本発明の測定方法に使用するための、第1試薬および第2試薬からなる2試薬系キットであり、前記第1試薬は、少なくともFAODを含み、第2試薬は、少なくともプロテアーゼを含み、さらに、PODおよび酸化により発色する基質のいずれか一方が前記第1試薬に、他方が前記第2試薬に含まれる、または、前記PODおよび前記基質の両者が前記第2試薬に含まれることを特徴とする。

[0070] 本発明の測定キットにおける第1試薬と第2試薬の組み合わせ(A-C)の具体例を以下に示す。

(A) 第1試薬:FAOD

第2試薬:プロテアーゼ+POD+発色性基質

(B) 第1試薬:FAOD+POD

第2試薬:プロテアーゼ+発色性基質

(C) 第1試薬:FAOD+発色性基質

第2試薬:プロテアーゼ+POD

[0071] また、本発明の試薬キットは、さらに測定精度を向上させるために、例えば、前記第1試薬が、前述のような、分解工程前に試料に添加し得るテトラゾリウム化合物、スルホン酸化合物、ニトロ化合物、界面活性剤等の添加物をさらに含んでもよい。また、血球を溶血する場合には、前記第1試薬に、さらに溶血試薬を含有させてもよい。また、各試薬における各成分の含有量は、特に制限されず、これらを反応系に添加した際に、反応液における濃度が前述のような濃度となる範囲に適宜設定できる。

[0072] このような本発明の試薬キットは、例えば、まず、試料に前記第1試薬を添加し、その後、前記第2試薬を添加することで、本発明の測定方法を実施することができる。前記第1試薬を添加した後の処理条件(例えば、温度や処理時間等)、ならびに第2試薬を添加した後の処理条件は、前述のとおりである。

### 実施例 1

[0073] (I) 血球試料に非測定対象糖化アミンとして各種糖化アミノ酸を添加し、血球中のHbA1cの測定を行った。

#### [0074] 血球試料

健康者の血液を遠心分離(3000G、10分間)し、回収した血球に下記糖化アミノ酸水溶液と水とを添加して、ヘマトクリット値が60%である全血試料を調製した。なお、全血試料における前記糖化アミノ酸水溶液の添加割合は、0体積%、1体積%、3体積%とした。前記糖化アミノ酸水溶液は、16種類の糖化アミノ酸(フルクトシルイソロイシン、フルクトシルロイシン、フルクトシルリジン、フルクトシルメチオニン、フルクトシルフェニルアラニン、フルクトシルトレオニン、フルクトシルトリプトファン、フルクトシルバリン、フルクトシルチロシン、フルクトシルアルギニン、フルクトシルヒスチジン、フルクトシルアラニン、フルクトシルアスパラギン酸、フルクトシルプロリン、フルクトシルセリン、フルクトシルグリシン)を含む溶液であり、各糖化アミノ酸の濃度は、それぞれ約0.02

〜0.4w/v%とした。

[0075] (実施例1)

以下に示す操作は、自動分析器(商品名JCA-BM8、日本電子社製)を用いて行った。まず、前記血球試料0.58  $\mu$ Lに精製水15  $\mu$ Lを添加した。なお、精製水を添加したのは、後述する比較例において添加する試薬a(15  $\mu$ L)に対する容量補正のためである。続いて、前記血球試料に下記第1試薬を74  $\mu$ L添加し、37°Cで約4分間インキュベートした後、混合溶液の吸光度を測定した(第一測定)。さらに、約1分後に、前記混合溶液に下記第2試薬を18.5  $\mu$ L添加し、37°Cで3分間インキュベートした後、この反応液の吸光度を測定した(第二測定)。吸光度測定は、いずれも主波長700nm、副波長570nmで行った。そして、第1測定の吸光度に89.58/108.08を乗じて用量補正を行い、第二測定の吸光度と前記第1測定の補正した吸光度との差( $\Delta$ Abs.)を求めた。そして、血球試料における糖化アミノ酸溶液の添加量が0体積%の場合の $\Delta$ Abs.を100%とし、各血球試料についての $\Delta$ Abs.の相対値(%)を算出した。この結果を実施例1として、下記表1に示す。なお、この $\Delta$ Abs.を、血液試料のHbA1c濃度として、後に考察する。

[0076]

第1試薬

ホウ酸(ナカライテスク社製)	1mmol/L
ジベレラ属由来FAOD(アークレイ社製)	5KU/L
テトラゾリウム化合物(商品名WST-3、同仁化学社製)	1.7mmol/L
NaN <sub>3</sub> (ナカライテスク社製)	0.66mmol/L
ポリオキシエチレンラウリルエーテル(日光ケミカル社製)	1g/L

第2試薬

Tris-HCl緩衝液	300mmol/L
POD(東洋紡社製)	67KU/L
発色性基質(商品名DA-64、和光純薬工業社製)	71.3 $\mu$ mol/L
CaCl <sub>2</sub> (ナカライテスク社製)	12.5mmol/L
NaCl(ナカライテスク社製)	200mmol/L
メタロプロテインナーゼ	10MU/L

[0077] (比較例1)

この例は、第1のFAODで非測定対象糖化アミンを分解した後、異なる第2のFAO

Dを用いて測定対象HbA1cと酸化還元反応させ、前記HbA1cの測定を行う従来法に関する比較例である。

- [0078] 前記精製水に代えて試薬a-1(15  $\mu$ L)、前記第1試薬に代えて下記試薬b(74  $\mu$ L)、前記第2試薬に代えて下記試薬cを添加した以外は、前記実施例1と同様にして吸光度の測定を行い、 $\Delta$  Abs.を求め、相対値(%)を算出した。これらの結果を下記表1に示す。下記試薬a-1における第1FAODとして商品名FAOX-TE(キッコーマン社製)を使用し、下記試薬cにおける第2FAODとしてジベレラ属由来FAOD(アークレイ社製)を使用した。なお、比較例1において前記試薬a-1は、血球の溶血および非測定対象糖化アミンの分解に使用する試薬であり、試薬bはHbA1cの分解に使用する試薬であり、試薬cはHbA1c分解物との酸化還元反応ならびに発色反応に使用する試薬である。

[0079]

試薬a-1

ポリオキシエチレンラウリルエーテル(日光ケミカル社製)	12g/L
CHE S(同仁化学社製)	80mmol/L
MOP S(同仁化学社製)	30mmol/L
第1FAOD	0.3KU/L

試薬b

MES(同仁化学社製)	1mmol/L
テトラゾリウム化合物(商品名WST-3、同仁化学社製)	1.7mmol/L
NaN <sub>3</sub> (ナカライテスク社製)	0.66mmol/L
CaCl <sub>2</sub> (ナカライテスク社製)	2.5mmol/L
NaCl(ナカライテスク社製)	50mmol/L
メタロプロテイナーゼ	10MU/L

試薬c

Tris-HCl緩衝液	300mmol/L
第2FAOD	17.4KU/L
POD(東洋紡社製)	67KU/L
発色性基質(商品名DA-64、和光純薬社製)	71.3 $\mu$ mol/L

[0080] (比較例2)

この例は、FAODで非測定対象糖化アミンを分解した後、前記FAODをプロテアーゼで失活させ、さらに同じFAODを添加して測定対象HbA1cの分解物と酸化還元

反応させ、前記HbA1cの測定を行う従来法に関する比較例である。

[0081] 前記比較例1における前記試薬a-1の第1FAODをジベレラ属FAOD(アークレイ社製)に代えた試薬a-2を使用した以外は、前記比較例1と同様にして吸光度の測定を行い、 $\Delta$  Abs.を求めて相対値(%)を算出した。これらの結果を下記表1に示す。なお、比較例2において、試薬a-2と試薬cとは同じFAODを使用することとなり、試薬bはHbA1cの分解ならびに試薬a-2におけるFAODの失活に使用する試薬となる。

[0082] (比較例3)

なお、比較例3としては、前記比較例1における試薬a-1にFAODを添加せずに精製水で用量補正した試薬a-3を使用した以外は、前記比較例1と同様にして吸光度の測定を行い、 $\Delta$  Abs.を求め、相対値(%)を算出した。

[0083] [表1]

X (体積%)	相対値 (%)			
	実施例 1	比較例 1	比較例 2	比較例 3
0	100	100	100	100
1	103	152	406	1033
3	87	294	952	7513

X: 血球試料における前記糖化アミノ酸水溶液の添加割合 (体積%)

[0084] 前記表1に示すように、FAOD無添加の試薬a-3を使用した比較例3は、HbA1cに対するFAODを用いた酸化還元反応に先立って、予め試料に添加した糖化アミノ酸が分解されていないため、糖化アミノ酸溶液の添加割合の増加に伴って、 $\Delta$  Abs.の相対値の著しい上昇が確認された。特に、糖化アミノ酸溶液の添加割合が3体積%の場合、 $\Delta$  Abs.が約75倍もの値を示した。また、前記酸化還元反応に先立って、添加した糖化アミノ酸をFAODによって処理した比較例1および2については、比較例3よりは抑制されたものの、 $\Delta$  Abs.の相対値の上昇は顕著であり、糖化アミノ酸溶液の添加割合が3体積%の場合、 $\Delta$  Abs.は、比較例1で約3倍、比較例2で約9.5倍の値を示した。これに対して、実施例1は、糖化アミノ酸溶液の添加割合を増加させても $\Delta$  Abs.の相対値には著しい変化はみられず、ほぼ一定の値を示し、糖化アミノ酸溶液の添加割合が3体積%の場合であっても、 $\Delta$  Abs.は1割程度の変化しかみられなかった。このような結果から、実施例によれば、非測定対象物である糖化アミノ酸が高濃

度であっても、非常に効果的な処理が可能であり、これによって測定対象糖化アミンを高精度に測定できることがわかる。

[0085] (II)さらに、実施例1における試薬1のFAOD濃度を变化させて、前記実施例1と同様の吸光度測定を行い、 $\Delta$  Abs.の相対値を算出した(第1試薬におけるFAOD濃度:3、5、10KU/L)。また、比較例1に関しては試薬a-1のFAOD濃度、比較例2に関しては試薬a-2のFAOD濃度をそれぞれ变化させ、同様にして $\Delta$  Abs.の相対値を算出した(前記試薬a-1および試薬a-2におけるFAOD濃度:0.3、3、30KU/L)。これらの結果を下記表2に示す。なお、下記表2において、FAOD濃度とは、実施例については第1試薬、比較例1については試薬a-1、比較例2については試薬a-2、比較例3については試薬a-3における濃度を表す。

[0086] [表2]

		相対値 (%)		
	FAOD濃度 (KU/L)	X : 0体積%	1体積%	3体積%
実施例 1	3	1 0 0	1 0 3	8 7
	5	1 0 0	1 0 3	8 7
	1 0	1 0 0	9 7	9 0
比較例 1	0. 3	1 0 0	3 1 3	1 1 5 1
	3	1 0 0	1 5 2	2 9 4
	3 0	1 0 0	1 4 2	2 2 5
比較例 2	0. 3	1 0 0	6 0 2	2 5 8 9
	3	1 0 0	4 0 6	9 5 2
	3 0	1 0 0	- 2 1 9	- 1 4 0 1
比較例 3	0	1 0 0	1 0 3 3	7 5 1 3

[0087] 前記表2に示すように、未処理の比較例3に対して、比較例1においては、試薬a-1におけるFAOD濃度を増加することによって、試料に添加した糖化アミノ酸を除去する能力は向上した。しかしながら、前述のように、糖化アミノ酸を除去するための試薬a-1のFAODと、測定対象HbA1cとの酸化還元反応に使用する試薬cのFAODとは、触媒機能が異なるため、試薬cのFAODが作用する糖化アミノ酸が残存し、吸光度の上昇をより一層抑制することはできなかった。また、比較例2においては、試薬a-2のFAOD濃度を増加させると、糖化アミノ酸を除去する能力は向上するが、さらにFAOD濃度を増加させると、試薬bによりプロテアーゼを添加しても、反対に前記FAOD

Dが失活することなく大量に残存する。このため、試薬cを添加する以前に、残存FAODとHb分解物とが反応してしまい、また、残存FAODにより発生した過酸化水素を、3試薬系であるために迅速にPODと反応させることもできず、反対に吸光度が低下してしまうという結果となった。これに対して、実施例1は、FAODの添加割合を変化させても、これに伴う吸光度の変化は特に見られなかったため、FAODの添加量によっては、測定系が影響を受けることなく、十分な精度での測定が可能であることがわかる。

## 実施例 2

[0088] 本発明における2試薬系試薬キットのバリエーションについて確認を行った。

[0089] (試料)

凍結乾燥されたグリコヘモグロビンコントロール血液を精製水1.8mLで溶解して試料を調製した。なお、前記凍結乾燥品としては、低濃度(Hb=2.4g/L、HbA1c%=4.3%)、中濃度(Hb=3.5g/L、HbA1c%=9.0%)、高濃度(Hb=3.1g/L、HbA1c%=11.7%)の3種類を使用した。

[0090] (試薬)

下記表3に示す第1試薬(2-1、2-2、2-3)および第2試薬(2-1、2-2、2-3)をそれぞれ、下記表4に示す組み合わせとなるように使用した。

[0091] [表3]

第1試薬	2-1	2-2	2-3	
Tris-HCl (pH 7.5)	10	10	10	mmol/L
FAOD (アークレイ)	5	5	5	KU/L
WST-3 (同仁化学研究所)	1.4	1.4	1.4	mmol/L
ポリオキシエチレンラウリルエーテル	1	1	1	g/L
POD	—	12	—	KU/L
DA-64 (和光純薬工業)	—	—	27	μmol/L

第2試薬	2-1	2-2	2-3	
Tris-HCl (pH 7.5)	30	30	30	mmol/L
プロテアーゼ (アークレイ)	30	30	30	MU/L
CaCl <sub>2</sub>	5	5	5	mmol/L
POD	36	—	36	KU/L
DA-64 (和光純薬工業)	81	81	—	μmol/L

## [0092] (測定方法)

前記試料13  $\mu$  Lと第1試薬76  $\mu$  Lとを混合して37℃で5分間インキュベーションした。さらに、第2試薬28  $\mu$  Lを混合して37℃で10分間インキュベーションした後、前記自動分析器により波長751nmの吸光度を測定した。その結果を下記表4に示す。

## [0093] [表4]

実施例	2-1	2-2	2-3
第1試薬	2-1	2-2	2-3
第2試薬	2-1	2-2	2-3
吸光度 低濃度	0.010	0.011	0.013
中濃度	0.015	0.015	0.017
高濃度	0.018	0.018	0.020

[0094] 前記表4に示すように、PODおよび発色性基質を第1試薬に含有させた実施例2-1、発色性基質を第2試薬に含有させた実施例2-2、および、PODを第2試薬、発色性基質を第1試薬に含有させた実施例2-3は、それぞれ同様の結果を示し、試料中のHbA1c(%)に応じて吸光度は上昇した。

## 産業上の利用可能性

[0095] 以上のように、本発明の測定方法によれば、FAODと反応する非測定対象の糖化アミンが試料中に含まれる場合であっても、十分にその影響を排除できるため、測定精度に優れる糖化アミンの測定が実現できる。特に、従来の測定方法においては、非測定対象糖化アミンを除去するために、通常、3工程以上の処理が必要であったが、本発明の測定方法によれば、前述のように2工程のみの処理であっても、従来よりも極めて優れた影響除去能を示す。このため、例えば、赤血球中の糖化Hbの測定に適用すれば、従来よりも測定精度が向上し、糖尿病診断等の指標物質としての重要性がさらに向上する。

### 請求の範囲

- [1] プロテアーゼを試料に添加して、前記プロテアーゼにより前記試料中の測定対象である糖化アミンを分解する工程と、前記試料にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOD) を添加して、前記FAODを糖化アミンの分解物に作用させて酸化還元反応を行う工程と、前記酸化還元反応を測定する工程と、前記酸化還元反応の測定結果により、前記糖化アミンの量を決定する工程とを含む、糖化アミンの測定方法であって、
- さらに、前記測定対象糖化アミンとは別に前記試料中に存在する非測定対象である糖化アミンの影響を除去することを目的として、前記プロテアーゼを添加する分解工程に先立ち、前記試料に前記FAODを添加して、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程を含み、
- 前記分解工程に先立って添加したFAODによって、前記分解工程後の前記酸化還元反応を行うことを特徴とする糖化アミンの測定方法。
- [2] 前記分解工程と、前記酸化還元工程と、前記酸化還元反応を測定する工程とを同時に行う、請求項1記載の測定方法。
- [3] 前記酸化還元反応工程が、前記FAODを前記糖化アミン分解物に作用させて過酸化水素を発生させる工程である請求項1記載の測定方法。
- [4] 前記酸化還元反応を測定する工程が、前記試料に酸化酵素と酸化により発色する基質とを添加して、前記発生した過酸化水素と前記基質とを前記酸化酵素により反応させる工程を含む請求項3記載の測定方法。
- [5] 前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程の後、前記試料に、プロテアーゼ、酸化酵素および酸化により発色する基質を同時に添加することによって、前記分解工程、前記酸化還元反応工程ならびに前記酸化還元反応の測定工程を同時に行う、請求項4記載の測定方法。
- [6] 前記分解工程に先立って、前記FAODと共に前記酸化酵素を前記試料に添加し、さらに、プロテアーゼおよび酸化により発色する基質を同時に前記試料に添加することによって、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程の後、前記分解工程、前記酸化還元反応工程ならびに前記酸化還元反応の測定工程を同時に行う、請求項4記載の測定方法。

- [7] 前記分解工程に先立って、前記FAODと共に前記酸化により発色する基質を前記試料に添加し、さらに、プロテアーゼおよび酸化酵素を同時に前記試料に添加することによって、前記FAODを前記非測定対象糖化アミンに作用させる工程の後、前記分解工程、前記酸化還元反応工程ならびに前記酸化還元反応の測定工程を同時に行う、請求項4記載の測定方法。
- [8] 前記酸化酵素が、ペルオキシダーゼである請求項4記載の測定方法。
- [9] 前記FAODが、アミノ酸残基の糖化された $\alpha$ -アミノ基に特異的に作用する酵素、アミノ酸残基の糖化された側鎖に特異的に作用する酵素、または、アミノ酸残基の糖化された $\alpha$ -アミノ基およびアミノ酸残基の糖化された側鎖に特異的に作用する酵素である、請求項1記載の測定方法。
- [10] 前記非測定対象糖化アミンが、糖化アミノ酸である、請求項1記載の測定方法。
- [11] 前記測定対象糖化アミンが、糖化ペプチドまたは糖化タンパク質である、請求項1記載の測定方法。
- [12] 前記測定対象糖化アミンが、血球内糖化アミンである、請求項1記載の測定方法。
- [13] 前記測定対象糖化アミンが、糖化ヘモグロビンである、請求項1記載の測定方法。
- [14] 前記分解工程前に、前記試料に、さらにテトラゾリウム化合物を添加する、請求項1記載の測定方法。
- [15] 前記テトラゾリウム化合物が、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムまたはその塩を含む、請求項14記載の測定方法。
- [16] 前記分解工程前に、前記試料に、さらに界面活性剤を添加する、請求項1記載の測定方法。
- [17] 前記界面活性剤が、両性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤および陽イオン性界面活性剤の少なくとも一方である、請求項16記載の測定方法。
- [18] 請求項1記載の測定方法に使用する試薬キットであって、第1試薬および第2試薬からなり、前記第1試薬が少なくともフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ(FAOD)を含み、前記第2試薬が、少なくともプロテアーゼを含み、さらに、ペルオキシダーゼおよび酸化により発色する基質のいずれか一方が前記第1試薬に、他方が前記第2試薬

にそれぞれ含まれる、または、前記ペルオキシダーゼおよび前記基質の両者が前記第2試薬に含まれることを特徴とする、試薬キット。

- [19] 前記第1試薬が、さらに、テトラゾリウム化合物を含む、請求項18記載の試薬キット。
- [20] 前記テトラゾリウム化合物が、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムまたはその塩を含む、請求項19記載の試薬キット。
- [21] 前記第1試薬が、さらに、界面活性剤を含む、請求項19記載の試薬キット。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018503

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/26, 1/37, G01N33/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-70, G01N33/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/033729 A1 (Arkray Kabushiki Kaisha), 24 April, 2003 (24.04.03), (Family: none)	1, 3, 4, 8-13, 16-18
Y		2, 5-7, 14, 15, 19-21
Y	JP 2000-210100 A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), 02 August, 2000 (02.08.00), & EP 1002874 A2 & US 2002/0025546 A1	2, 5-7, 14, 15, 19-21
Y	JP 2000-333696 A (Arkray Kabushiki Kaisha), 05 December, 2000 (05.12.00), (Family: none)	2, 5-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 February, 2005 (04.02.05)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2005 (22.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018503

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2003/033730 A1 (Arkray Kabushiki Kaisha), 24 April, 2003 (24.04.03), (Family: none)	14, 15, 19-21
Y	WO 2002/027012 A1 (Arkray Kabushiki Kaisha), 04 April, 2002 (04.04.02), & EP 1329512 A1 & US 2003/0186346 A1	14, 15, 19-21
A	JP 2000-097927 A (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.), 07 April, 2000 (07.04.00), (Family: none)	1-21

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/26, 1/37, G01N 33/72

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q 1/00-70, G01N 33/72

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/033729 A1 (アークレイ株式会社) 2003. 04. 24 (ファミリーなし)	1, 3, 4, 8-13, 16-18
Y		2, 5-7, 14, 15, 19-21
Y	JP 2000-210100 A (株式会社京都第一科学) 2000. 08. 02 & EP 1002874 A2 & US 2002/0025546 A1	2, 5-7, 14, 15, 19-21
Y	JP 2000-333696 A (アークレイ株式会社) 2000. 12. 05 (ファミリーなし)	2, 5-7

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 02. 2005

国際調査報告の発送日

22. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4 N

9 2 8 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2003/033730 A1 (アークレイ株式会社) 2003. 04. 24 (ファミリーなし)	14, 15, 19-21
Y	WO 2002/027012 A1 (アークレイ株式会社) 2002. 04. 04 & EP 1329512 A1 & US 2003/0186346 A1	14, 15, 19-21
A	JP 2000-097927 A (株式会社京都第一科学) 2000. 04. 07 (ファミリーなし)	1-21